

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D' INVENTION

NO 904.402

CLASSIF. INTERNAT.: C12Q

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

MIS EN LECTURE LE: 12 Septembre 1986

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention

Vu le procès-verbal dressé le 12 Mars 1986 A 15h 25

à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES (IRIBHN)
50-52 Avenue F. Roosevelt, 1050 Bruxelles(BELGIQUE)

REPR. PAR Bureau Gevers S.A. à 1050 Bruxelles
un brevet d'invention pour MOULE DE SONDE DE DETECTION DE SEQUENDE D'ADN ET
PREPARATION D'UN TEL MOULE ET D'UNE TELLE SONDE.(INV.: Daniel Christophe)

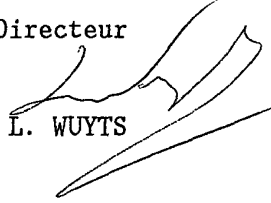
ARTICLE 2.- Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

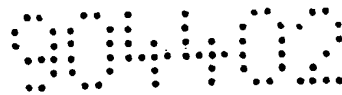
Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 12 Septembre 1986

PAR DELEGATION SPECIALE

Le Directeur


L. WUYTS



MEMOIRE DESCRIPTIF

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

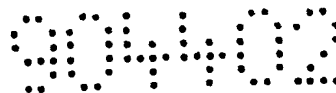
formée par

Université Libre de Bruxelles (IRIBHN)

pour :

"Moule de sonde de détection de séquence d'ADN et préparation d'un tel moule et d'une telle sonde"

INVENTEUR : Daniel CHRISTOPHE



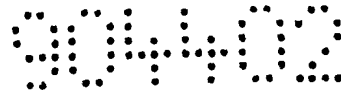
Moule de sonde de détection de séquence d'ADN et préparation d'un tel moule et d'une telle sonde.

5 La présente invention est relative à un moule de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant une partie d'ADN vecteur monobrin et une séquence d'ADN monobrin insérée sur le vecteur et complémentaire de la sonde recherchée, une région complémentaire d'une amorce de séquence étant située juste en amont de la séquence insérée.

10 Elle concerne également un procédé de préparation de moule de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant la réalisation d'un ADN recombinant cyclique contenant une partie d'ADN vecteur monobrin et une séquence d'ADN monobrin insérée sur le vecteur et complémentaire de la sonde recherchée, une région complémentaire d'une amorce de séquence étant située juste en amont de la séquence insérée et au moins un site de restriction étant situé juste en aval de la séquence d'ADN insérée, ainsi que les moules obtenus.

15 Elle concerne aussi un procédé de préparation de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant l'appariement d'une amorce de séquence à une région complémentaire d'un moule monobrin de la sonde, l'allongement de l'amorce de séquence appariée au moins jusqu'à la formation de la sonde le long du moule et l'isolement de la sonde formée, ainsi que les sondes obtenues et leur application, notamment à des procédés de diagnostic et d'analyse de gènes.

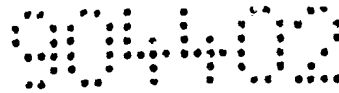
25 Les techniques d'analyse de gène tirent profit de l'état double brin de l'ADN. La capacité des brins d'ADN de former des structures doubles permet la détection de séquences spécifiques



par hybridation avec un brin-sonde complémentaire marqué. Aussi, en fonction de la méthodologie utilisée, des différences subtiles entre ces brins hybridés peuvent être détectées. Le besoin de procédés permettant une préparation aisée de brins spécifiques d'ADN est évident. L'efficacité globale des hybridations d'ADN peut être augmentée par l'utilisation de sondes monobrin et certaines nouvelles techniques reposent sur l'utilisation de fragments d'ADN monobrin. De courtes séquences peuvent être aisément produites par synthèse chimique d'ADN. Cependant cette technique n'est pas appropriée, lorsqu'on traite des fragments longs de plusieurs centaines de bases.

Actuellement, on connaît des procédés de préparation de grandes sondes monobrin d'ADN à partir de précurseurs double brin, par sédimentation (v.G.A. RICHA, J.M. TAYLOR et J.E. KALINYAK, Simple rapid method for the synthesis of radioactively labeled cDNA hybridization probes utilizing bacteriophage M13mp7, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.79, p.724-728, Février 1982).

On connaît également des procédés de préparation de moule de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique, tels que celui décrit au début. On utilise les moules obtenus par ces procédés pour la préparation de sondes, cette préparation comprenant l'appariement de l'amorce de séquence au moule, l'allongement de l'amorce de séquence appariée au moins jusqu'au site de restriction précité, de façon à former un brin complémentaire au moins de la séquence insérée entière, le clivage du moule alors partiellement à double brin au site de restriction susdit de façon à assurer sa linéarisation, et l'application de conditions de dénaturation qui séparent d'une extrémité du moule un fragment du brin complémentaire qui correspond à la sonde monobrin recherchée et de l'autre extrémité du moule le reste du brin complémentaire, la sonde étant isolée ensuite du moule linéaire et du reste de brin complémentaire par des processus connus, tels qu'une électrophorèse (v. R.M. MYERS, N. LUMELSKY, L.S. LERMAN et T. MANIATIS, Detection of single base substitutions in total genomic DNA, Nature, vol.313, Février 1985, p. 495 à 498; M. ANTONIOU, K.GUZMAN, S. CHAKRABORTY et M.R. BANERJEE, A generally applicable



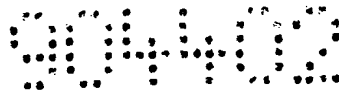
improved method for preparation of single stranded cDNA probes from clones constructed in M13 vectors, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 11 (1985) 203-212).

5 Tous ces procédés de préparation de moule se limitent à la préparation d'un moule cyclique, destiné à être perdu après son utilisation pour la préparation d'une seule sonde. L'isolement de la sonde dans un milieu contenant non seulement celle-ci mais aussi le moule alors linéaire et d'éventuels fragments du brin complémentaire clivé, ne correspondant pas à la sonde recherchée, est
10 une opération longue, compliquée et coûteuse.

Une synthèse in vitro de sondes d'acide ribonucléique (ARN) constitue aussi une voie attirante pour la préparation de sondes monobrin spécifiques, mais comme des hybrides d'ADN-ARN sont alors formés, cela peut gêner l'analyse ultérieure basée sur les
15 propriétés d'ADN double brin (par exemple le comportement à la fusion, les digestions enzymatiques). La manipulation de molécules d'ARN est aussi assez pénible étant donné le soin extrême qui est nécessaire pour éviter une dégradation par de la ribonucléase. En fait, le moule d'ADN doit être éliminé par une digestion ultérieure
20 par de la désoxyribonucléase "exempte de ribonucléase".

La présente invention a pour but la mise au point d'un moule de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'ADN monobrin qui puisse supporter plusieurs opérations successives de
25 synthèse amorcée de sonde et qui permette un isolement rapide et aisé des copies obtenues par libération dans de simples conditions de dénaturation. L'invention a également pour but la préparation d'un tel moule et la préparation répétitive de sondes à partir d'un tel moule, ainsi que l'application de ces sondes à des procédés de diagnostic ou d'analyse de gènes, et ce sans les inconvénients des
30 procédés selon la technique antérieure.

On a résolu ces problèmes, suivant l'invention, en prévoyant un moule tel que décrit au début, ce moule étant, sous une forme linéarisée, en position immobilisée sur un support approprié par une région du brin située en dehors de la séquence insérée, celle-ci
35 étant disposée à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé. Ainsi qu'il est connu, la liaison des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs)



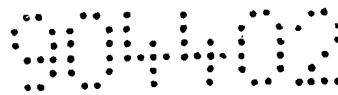
pour former la chaîne moléculaire d'un ADN s'effectue dans un sens déterminé, et, par les termes amont et aval, il faut entendre une position relative sur le brin d'ADN en fonction de ce sens de synthèse.

5 Suivant une forme de réalisation avantageuse de l'invention, le support utilisé est un papier diazoté.

On a également prévu, suivant l'invention, un procédé de préparation de moule, tel que décrit au début, ce procédé comprenant l'appariement de l'amorce de séquence à l'ADN recombinant, l'allongement de l'amorce de séquence appariée au moins jusqu'au site de restriction susdit, de façon à former un brin protecteur complémentaire au moins de la séquence insérée entière, le clivage du recombinant alors partiellement double brin au site de restriction susdit de façon à assurer sa linéarisation, l'immobilisation du recombinant linéarisé sur un support approprié par sa région non protégée par le brin protecteur ou un fragment de ce dernier, et l'élimination ultérieure du brin protecteur ou des fragments de celui-ci dans des conditions de dénaturation, avec formation d'un moule qui, sous forme linéarisée, est en position immobilisée sur le support par une région située en dehors de la séquence insérée complémentaire de la sonde, la séquence insérée étant disposée à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé avec la région complémentaire de l'amorce de séquence située juste en amont.

15 Il est aussi prévu, suivant l'invention, un procédé de préparation de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'ADN monobrin, tel que décrit au début, ce procédé comprenant l'appariement susdit à un moule immobilisé tel que décrit ci-dessus et/ou tel qu'obtenu selon un procédé de préparation de moule immobilisé tel que décrit ci-dessus, l'allongement de l'amorce de séquence appariée jusqu'à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé, ce qui forme une sonde complémentaire de la séquence insérée du moule, et la libération et l'isolement de la sonde obtenue dans de simples conditions de dénaturation, le moule restant immobilisé sur son support.

25 30 35 Suivant une forme de réalisation avantageuse de ce procédé, il comprend sa répétition à plusieurs reprises sur le même



moule immobilisé, en permettant la formation d'un nombre correspondant de sondes parfaitement identiques.

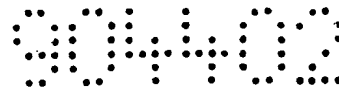
Suivant une forme de réalisation perfectionnée de ce procédé, il comprend le marquage d'une manière appropriée quelconque de la sonde, de manière à permettre sa détection lors d'une mise en oeuvre ultérieure.

D'autres détails et particularités de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après à titre non limitatif et avec référence à la figure unique annexée qui représente de manière schématique un procédé de préparation de sonde suivant l'invention.

L'étape 1 du procédé consiste en la préparation d'un ADN recombinant monobrin cyclique. Cette préparation a lieu selon des méthodes standards et n'est donc pas décrite de manière plus détaillée. Elle consiste dans le clonage d'une séquence d'ADN recherchée (I) dans un ADN vecteur (V), par exemple un bactériophage M13.

Il doit être entendu que la partie de vecteur (V) du recombinant n'est en aucune façon critique pour l'invention. Les seules conditions nécessaires du recombinant préparé sont la disposition juste en amont de la séquence insérée d'une région complémentaire (A') d'une amorce de séquence et la présence d'un site de restriction (SR_1) juste en aval de la séquence insérée (I). Le recombinant illustré dans l'étape 1 de la figure présente en outre un second site de restriction (SR_2) entre la région complémentaire (A') et la séquence insérée (I).

Dans l'étape 2, l'ADN recombinant monobrin passe partiellement à l'état double brin par appariement d'une amorce de séquence (A) à la région complémentaire (A') et par allongement de cette amorce de séquence (A) conventionnelle de telle façon qu'un brin, appelé brin protecteur (BP), couvre toute la séquence insérée (I), tout en laissant la plus grande part de la partie de vecteur M13 (V) à l'état monobrin. L'ADN est ensuite étalé en ligne par digestion dans l'étape 3 avec une enzyme de restriction (ER) qui, ainsi qu'il est illustré par la flèche F, coupe la région à double brin en aval de la séquence insérée (I) (par rapport au site d'amorçage), au site de restriction SR_1 . La molécule linéaire est alors dans l'étape

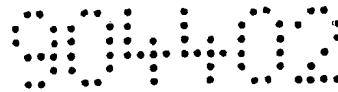


4, couplée à du papier diazoté (PD). Comme le couplage requiert de l'ADN monobrin, la présence du second brin ou brin protecteur (BP) empêche tout couplage au niveau du site de la séquence insérée (I) et du site d'amorçage (A). Ce brin de protection (BP) est ensuite
5 éliminé par dénaturation dans l'étape 5, ce qui laisse un moule linéaire immobilisé, prêt pour la préparation d'une sonde. Après appariement et allongement d'une amorce de séquence (A) de M13, un second brin est formé dans l'étape 6 et il recouvre la séquence insérée (I) en se terminant au point de clivage correspondant au site de
10 restriction SRI. Par dénaturation dans l'étape 7 de cet hybride, le monobrin d'ADN souhaité, c'est-à-dire une sonde (S), est libéré. Le brin servant de moule, qui est couplé au papier, peut être réutilisé plusieurs fois successivement.

Etape 2 :

15 Synthèse du brin protecteur (BP) : On définit tout d'abord les conditions nécessaires pour obtenir une synthèse efficace du brin protecteur sur l'ADN recombinant monobrin. Dans le cas illustré il s'agit du recombinant M13mp8 contenant un fragment génomique Pst I d'une longueur de 1.400 b du gène de la thyroglobuline de
20 boeuf. Un excès molaire modéré (2,5) d'amorce de séquence (A) est utilisé en vue de permettre l'efficacité optimale de l'appariement de l'amorce de séquence (A) à la région complémentaire (A') du recombinant. Des allongements sont effectués dans différentes conditions et en présence de dNTP's et d'ADN polymérase (EP).
25 Les longueurs des brins synthétisés sont analysées par électrophorèse sur gel dans des conditions de dénaturation (non représentées). Un mélange des réactifs à 0°C pendant 5 minutes et le passage du mélange résultant à 65°C directement permettent une synthèse efficace de brins d'une longueur de 1.400 à 2.100 b (b = bases).

30 Ces conditions ne sont pas critiques, elles sont en fait appropriées pour la longueur de la séquence insérée choisie (I). Elles sont aussi utilisées pour des longueurs de séquence insérées plus petites (voir ci-dessous). Lorsqu'on traite des séquences insérées plus grandes, il est préférable d'effectuer une courte incubation
35 à la température ambiante avant de chauffer le mélange réactionnel



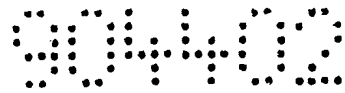
à 65°C (par exemple l'introduction d'une minute d'incubation à la température ambiante conduit à une synthèse de brins de 1.700 à 2.850 b).

Etape 3 :

5 En vue d'obtenir la production de sondes monobrin de longueurs définies, le recombinant doit être coupé en aval de la séquence insérée. Une enzyme de restriction appropriée pour le site de restriction SRI est alors mise en présence du recombinant et elle agit à l'endroit marqué par la flèche F sur la figure. Cela
10 est habituellement contrôlé par analyse d'un aliquote d'ADN restreint sur du gel d'agarose neutre.

Etapes 4 et 5 :

15 Il est connu de coupler de l'ADN dénaturé sur du papier diazoté, et cette opération est habituellement effectuée à un pH de 4 (v. M.L. GOLDBERG, R.P. LIFTON, G.R. STARK et J.G. WILLIAMS, Isolation of specific RNAs using DNA covalently linked to diazobenzoyloxymethyl cellulose or paper, Methods in Enzymology, 68 (1979) 206-220; J.C. ALWINE, D.J. KEMP, B.A. PARKER, J. REISER, J. RENART, G.R. STARK et G.M. WAHL, Detection of
20 specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper, Methods in Enzymology, 68 (1979) 220-242; D. CHRISTOPHE, H. BROCAS et G. VASSART, Improved synthesis of DBM-paper, Anal. Biochem. 120 (1982) 259-261) ce qui représente un compromis tenant compte des stabilités à la
25 fois de la fonction diazonium et de l'ADN. Lorsque la fixation sur du papier diazoté de l'ADN partiellement double brin de l'étape 4 a été effectuée à ce pH, il n'a jamais été possible de copier efficacement ensuite la séquence insérée. L'augmentation du pH du milieu de couplage à 4,5 a pour effet la production d'un moule immobilisé, totalement fonctionnel. Des résultats plus médiocres sont obtenus
30 lorsque la fixation est effectuée à un pH de 5 ce qui a probablement été dû au fait que l'efficacité du couplage diminue de manière prononcée à un tel pH. L'étape de couplage-élimination de la protection peut être contrôlée simplement par comptage lorsque le brin protecteur
35 (BP) est marqué de façon radioactive. Dans les expériences préliminaires



les échantillons ont aussi passé sur du gel d'agarose dénaturant et ont été autoradiographiés en vue de vérifier l'intégrité du brin de protection. Une immobilisation appropriée a pour résultat la libération d'une quantité importante de ce brin dans les solutions de lavage à base de NaOH 0,1M.

Il faut noter que le papier diazonium est un exemple de réalisation de support approprié pour l'immobilisation du moule. Il doit évidemment être entendu que tous les supports appropriés dans ce but sont compris dans le cadre de l'invention. On peut entre autres citer, outre les papiers diazotés tels que les papiers DBM (diazobenzoyloxyméthyle ou ABM aminobenzoyloxyméthyle), DPT (diazophénylthioéther ou APT aminothiophénol), des papiers activés à l'halogénure de cyanogène, par exemple au chlorure ou au bromure de cyanogène.

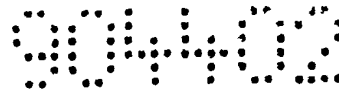
Les conditions d'immobilisation seront évidemment différentes en fonction du support choisi.

Etape 6 :

Au moule immobilisé ainsi produit, on apparie une amorce de séquence de M13 (A) et l'allongement de celle-ci engendre la synthèse d'une copie fidèle de la sonde attendue (S). Comme dans l'étape 2, cette synthèse s'effectue en présence de dNTP's et d'ADN polymérase (EP).

Etape 7 :

Après séparation de la sonde (S) par dénaturation, on peut utiliser plusieurs fois, sans perte apparente de sécurité, le même moule immobilisé pour la fabrication de sondes successives. Une certaine diminution de la quantité d'ADN synthétisé peut être observée après des usages répétés. L'activité spécifique des brins synthétisés peut être ajustée par modification de l'activité spécifique des désoxynucléotides précurseurs. Dans le cas présent, l'activité spécifique attendue est d'environ 10^9 cpm/ μ g d'ADN (en supposant une teneur de 25% de résidus de désoxyadénosine d'une activité spécifique de 800 Ci/mmole). A partir de cela on peut estimer la quantité d'ADN synthétisé qui varie de 10 à 100 ng par moule considéré.



Un exemple de procédé de préparation de moule et de procédé de préparation de sonde suivant l'invention va à présent être décrit de manière plus détaillée, à titre illustratif, et non limitatif.

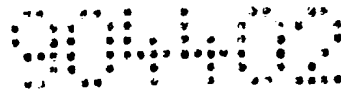
Exemple 1

5 a) Préparation de manière connue d'ADN recombinant monobrin cyclique à partir d'un clone de bactériophage M13 et d'un ADN génomique prédéterminé.

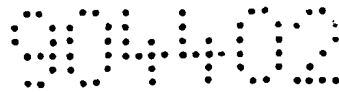
b) Appariement d'une amorce de séquence, son allongement sur le recombinant et clivage ultérieur de ce dernier :

10 Environ 4 μg d'ADN M13 monobrin (culot sec) sont hybridés avec de l'amorce de séquence de M13 synthétique (25 μl ; PL Biochemicals n° 1534) en présence de 4 μl de tampon H (100 mM de Tris-HCl [pH de 8,5], 100 mM de MgCl_2), avec chauffage à 56°C pendant 30 minutes et refroidissement à la température ambiante (15 minutes). Le mélange est alors placé sur de la glace et les réactifs suivants sont ajoutés à l'état froid : 5 μl d'une solution de dATP (désoxyadénosine triphosphate) + dCTP (désoxycytidine triphosphate) + dGTP (désoxyguanine triphosphate) + dTTP (désoxythymidine triphosphate) (0,5 mM chacun), éventuellement 1,5 μl de [20 α -³²P]dATP (Amersham, 800 Ci/mole, 10 mCi/ml de solution aqueuse), et 2,5 μl (12,5 U) du grand fragment (de Klenow) d'ADN-polymérase I (Boehringer). Après abandon à 0°C pendant 5 minutes, on transfère le mélange dans un bain-marie, préchauffé à 65°C, et on l'abandonne là pendant 10 minutes. L'allongement de l'amorce de séquence a 25 pour effet la formation d'un brin protecteur complémentaire de la séquence insérée au moins jusqu'au site de restriction prévu. On effectue alors une digestion ultérieure de l'ADN partiellement double brin résultant avec une enzyme de restriction appropriée pour ce site de restriction, ce qui donne un ADN linéarisé, partiellement 30 double brin. On ne procède pas à une purification ultérieure.

35 c) Immobilisation de l'ADN linéarisé obtenu sur un support. Comme support, du papier diazoté du type DBM (diazobenzoyloxyméthyle) est préparé d'une manière connue à l'exception du fait que seuls 56 mg de NBPC (chlorure de N-(3-nitrobenzoyloxyméthyl)-pyridinium) (au lieu de 280 mg) sont utilisés pour chaque filtre Whatman 540



- (9cm de diamètre). Par conséquent une diazotation de cercles de 0,2 cm² ("confetti", diamètre de 5mm) de papier ABM (aminobenzylloxyméthyle) est réalisée dans 1ml de HCl 1M en utilisant 6 µl d'une solution de 10 mg de NaNO₂/ml. Le papier DBM est lavé à trois reprises avec 1ml d'acétate de sodium 1M (pH de 4,5) à 0°C. L'ADN linéarisé obtenu (culot sec) est redissous dans 6 µl d'eau; on ajoute alors 4 µl d'acétate de sodium 2,5 M (pH de 4,5) et on imprègne de cette solution le confetti de papier DBM, préalablement essoré au buvard.
- 5
- d) Application de conditions dénaturantes et formation du moule. Le confetti est ensuite mis à incuber dans 1ml de TE (10mM de Tris HCl [pH de 8], 1mM de EDTA (éthylènediaminetétracétate)) contenant 100 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé, cisailé (longueur de fragment moyenne de 0,5 à 1kb) à 37°C pendant 15 minutes. On poursuit le lavage à la température ambiante, à trois reprises avec du TE (1ml par lavage), à trois reprises avec du NaOH 0,1M et à nouveau à trois reprises avec du TE. Le confetti est ensuite entreposé à 4°C dans du TE.
- 10
- e) Synthèse de sonde à partir du moule immobilisé.
- 20
- Le confetti est lavé avec 1ml de tampon H dilué 10 fois et il est essoré au buvard. Il est ensuite imprégné de 2 µl de tampon H et de 10 µl de solution d'amorce de séquence (PL Biochemicals n° 1534). Après chauffage à 37°C pendant 20 minutes et refroidissement à la température ambiante (15 minutes), on ajoute un mélange des réactifs suivants : 5 µl de [α -³²P] dATP (Amersham; 800 Ci/mme, 10 mCi/ml de solution aqueuse), 1 µl de solution de dCTP + dGTP + dTTP (0,66 mM de chacun) et 1 µl (5U) du grand fragment (de Klenow) d'ADN-polymérase I (Boehringer). Après abandon pendant 1 heure à la température ambiante, le confetti est lavé à 5 reprises avec du TE (5 ml par lavage). La sonde formée est libérée pendant deux incubations successives dans 0,5 ml de NaOH 0,1M à la température ambiante. Le confetti est ensuite lavé à deux reprises avec du NaOH 0,1M, puis à deux reprises avec du TE, avant d'être à nouveau entreposé en vue de sa réutilisation pour la préparation d'une nouvelle sonde.
- 25
- 30
- 35
- f) Hybridations de la sonde de détection.



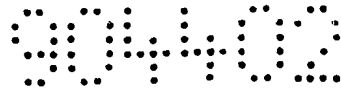
Des buvardages selon Southern d'ADN génomique restreint sont réalisés en utilisant des membranes Hybond-N (Amersham). Les buvardages sont effectués, comme recommandé par le fabricant des membranes. La sonde (libérée du confetti dans 1ml de NaOH 0,1M) est neutralisée par des additions successives de 1ml de Tris HCl 1M (pH de 8) et de 1 ml de HCl 0,1M avant son addition dans le milieu d'hybridation (6 x SSC (0,15M de NaCl, 0,015M de citrate de Na), 5 x solution de Denhardt, 0,5% de SDS, 20 µg/ml d'ADN de sperme de saumon cisailé, dénaturé). On effectue l'hybridation et les lavages à 65°C. Les membranes sont autoradiographiées (films Kodak XAR-5) après un lavage final dans 0,1 x SSC.

Pour l'hybridation en solution, la sonde est neutralisée par addition de 0,25 ml d'acétate de sodium 2,5M (pH de 4,5) et des aliquotes contenant environ 10^7 cpm sont mélangés à 10 µg d'ADN génomique restreint. L'ADN est précipité dans de l'éthanol et redissous dans 20 µl de NaCl 0,5M. Après chauffage à 100°C (5 minutes), la solution est mise à incuber pendant 4 heures à 50°C. 4000 unités de nucléase S_1 (Boehringer) dans 200 µl de tampon S_1 (50mM d'acétate de sodium [pH de 4,5], 300 mM de NaCl, 4mM de $ZnSO_4$ et 20 µg/ml de t-ARN) sont ensuite ajoutées et on laisse le mélange incuber pendant 1 heure à 50°C. On interrompt la digestion par addition d'un volume égal d'une solution de Tris HCl 0,3M (pH de 8), EDTA 5mM. On extrait le mélange par du phénol et on fait précipiter l'ADN dans de l'éthanol. On analyse les hybrides ultérieurement restreints sur des gels d'urée 8M - 8% d'acrylamide. Les gels sont séchés avant d'être autoradiographiés.

Ainsi qu'il vient d'être décrit ci-dessus dans l'exemple de réalisation donné, les sondes produites peuvent être appliquées pour détecter des fragments spécifiques de gènes, par hybridation. D'autres exemples d'application vont être donnés ci-dessous, à titre non limitatif.

Exemple 2

Une sonde de 1400 bases produite suivant l'invention peut être utilisée dans des expériences de buvardage selon Southern pour détecter des fragments spécifiques de gène de thyroglobuline.



Cette sonde permet notamment une visualisation distincte d'un fragment génomique EcoRI de 8,8 kb qui contient la séquence de 1400 bp.

Exemple 3

5 L'état monobrin et la haute activité spécifique des sondes suivant l'invention peuvent être exploités pour révéler de très petites séquences uniques dans l'ADN génomique total en utilisant une hybridation en solution et une électrophorèse sur gel d'acrylamide d'hybrides restreints. Le procédé est dérivé de celui décrit par Williamson et par Myers et coll. En abrégé, on utilise une sonde

10 monobrin marquée, par exemple par un isotope radioactif de phosphore.

Comme on a pu le voir ce marquage peut être effectué dans l'étape 6 du procédé illustré sur la figure annexée, par mise en oeuvre, par exemple parmi les dNTP's de la réaction, de désoxyadénosine triphosphate marqué par du ^{32}P en position α . Il est évident que

15 d'autres types de marquage sont concevables.

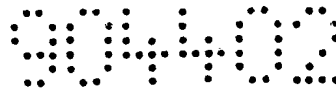
La sonde monobrin marquée et isolée est hybridée avec l'ADN génomique restreint, dénaturé. Une digestion par de la nucléase S_1 est alors effectuée en vue d'éliminer l'excès de sonde et pour rogner toute matière monobrin des hybrides. Les hybrides sont ensuite digérés

20 par une endonucléase de restriction. Les fragments résultants sont séparés sur un gel d'acrylamide dénaturant et visualisés par autoradiographie du gel. On a appliqué cette technique à la détection de petits fragments MboII de la région amont du gène humain de thyroglobuline dans l'ADN génomique humain total. La région promotrice

25 du gène humain de thyroglobuline contient une très longue séquence (209 bp) de poly(purine)-poly(pyrimidine) qui révèle cinq sites de restriction MboII. Des fragments internes de 12, 32, 40 et 44 bp sont attendus de la séquence disponible. Un moule immobilisé sur confetti est réalisé par utilisation du clone M13 4S-4 qui contient

30 la séquence insérée "SstI", d'une longueur de 400b, qui comprend le segment de poly(purine). La sonde monobrin correspondante est préparée et hybridée à l'ADN restreint SstI provenant du foie ou de la thyroïde d'un être humain. Après digestion à la nucléase S_1 , les hybrides sont coupés par MboII et les fragments résultants sont

35 analysés par électrophorèse sur urée-gel d'acrylamide et autoradiographie.



Les fragments internes attendus sont aisément détectés.

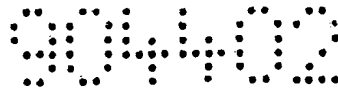
On a donc développé un nouveau procédé qui permet la préparation aisée de fragments d'ADN monobrin spécifiques. De plus, étant donné l'immobilisation covalente du brin servant de moule, plusieurs opérations successives de synthèse d'ADN monobrin peuvent être obtenues sur le même ADN servant de moule. Si des précurseurs radioactifs sont utilisés dans l'étape de synthèse, des sondes d'ADN monobrin d'activité spécifique choisie sont obtenues.

Ces sondes remplacent avantageusement l'ADN marqué double brin, utilisé couramment dans des expériences d'hybridation d'ADN. Elles peuvent aussi être utilisées pour détecter de très petites séquences uniques dans le génome total. Sous ce rapport, elles représentent un outil de base pour l'étude du polymorphisme de longueur de fragment de restriction mettant en oeuvre des endonucléases de restriction qui coupent l'ADN fréquemment.

Les moules suivant l'invention, immobilisés sur confetti sous forme linéaire, peuvent être entreposés sous une forme prête à l'usage et sont aisés à manipuler. Conjointement à la simplicité de la synthèse de sonde et des étapes de libération de celle-ci, cela rend plus attrayant le procédé pour l'utilisation future dans des systèmes d'analyse de gène courants.

Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux modes de réalisation décrits ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre du présent brevet.

On peut par exemple concevoir d'autres conditions de dénaturation ou de marquage que celles appliquées dans les exemples. Le marquage peut par exemple ne pas être un marquage radioactif. Des supports autres que ceux à base de papier entrent également dans le cadre de la présente invention, par exemple des membranes ou tout autre support poreux, tel que des microbilles entre autres.



REVENDICATIONS

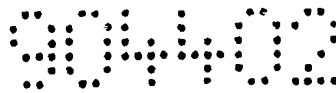
5 1. Moule de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant une partie d'ADN vecteur monobrin et une séquence d'ADN monobrin insérée sur le vecteur et complémentaire de la sonde recherchée, une région complémentaire d'une amorce de séquence étant située juste en amont de la séquence insérée, caractérisé en ce que le moule est, sous une forme linéarisée, en position immobilisée sur un support approprié par une région située en dehors de la séquence insérée et en ce que la séquence insérée est disposée à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé.

15 2. Moule suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend, comme support, du papier, de la cellulose ou une matière analogue, préalablement traité, le papier pouvant se présenter sous forme de confetti.

20 3. Moule suivant la revendication 2, caractérisé en ce que le support est du papier, de la cellulose ou une matière analogue, diazoté, notamment du papier DBM (ABM), DPT (APT), ou analogue.

25 4. Moule suivant la revendication 2, caractérisé en ce que le support est du papier activé à l'halogénure de cyanogène, notamment au chlorure ou au bromure de cyanogène.

30 5. Procédé de préparation de moule de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant la réalisation d'un ADN recombinant cyclique contenant une partie d'ADN vecteur monobrin et une séquence d'ADN monobrin insérée sur le vecteur et complémentaire de la sonde recherchée, une région complémentaire d'une amorce de séquence étant située juste en amont de la séquence insérée et au moins un site de restriction étant situé juste en aval de la séquence d'ADN insérée, caractérisé en ce qu'il comprend l'appariement de l'amorce de séquence à l'ADN recombinant, l'allongement de l'amorce de séquence appariée au moins jusqu'au site de restriction susdit, de façon à former un brin protecteur complémentaire au moins de la séquence insérée
35 entière, le clivage du recombinant alors partiellement à double brin



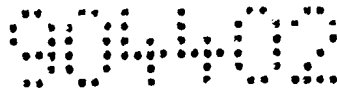
au site de restriction susdit de façon à assurer sa linéarisation, l'immobilisation du recombinant linéarisé sur un support approprié par sa région non protégée par le brin protecteur ou un fragment de ce dernier, et l'élimination ultérieure du brin protecteur ou des fragments de celui-ci dans des conditions de dénaturation, avec formation d'un moule qui, sous forme linéarisée, est en position immobilisée sur le support par une région située en dehors de la séquence insérée complémentaire de la sonde, la séquence insérée étant disposée à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé avec la région complémentaire de l'amorce de séquence située juste en amont.

5
10
6. Procédé de préparation suivant la revendication 5, caractérisé en ce que, comme support approprié, on utilise du papier, de la cellulose ou une matière analogue, préalablement traité, le papier pouvant être façonné en forme de confetti.

15
7. Procédé de préparation suivant la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend l'immobilisation sur un papier diazoté de type DBM dans un milieu présentant un pH de 4,5 à 5, de préférence de 4,5.

20
25
30
8. Procédé de préparation de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant l'appariement d'une amorce de séquence à une région complémentaire d'un moule monobrin de la sonde, l'allongement de l'amorce de séquence au moins jusqu'à la formation de la sonde le long du moule et l'isolement de la sonde formée caractérisé en ce qu'il comprend l'appariement susdit à un moule immobilisé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, l'allongement de l'amorce de séquence appariée jusqu'à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé, ce qui forme une sonde complémentaire de la séquence insérée du moule, et la libération et l'isolement de la sonde obtenue dans de simples conditions de dénaturation, le moule restant immobilisé sur son support.

35
9. Procédé de préparation de sonde de détection d'une séquence prédéterminée d'acide désoxyribonucléique (ADN) monobrin, comprenant l'appariement d'une amorce de séquence à une région complémentaire d'un moule monobrin de la sonde, l'allongement



de l'amorce de séquence au moins jusqu'à la formation de la sonde le long du moule et l'isolement de la sonde formée, caractérisé en ce qu'il comprend l'appariement susdit à un moule immobilisé obtenu selon le procédé suivant l'une quelconque des revendications 5 à 7, l'allongement de l'amorce de séquence appariée jusqu'à l'extrémité du côté aval du moule immobilisé, ce qui forme une sonde complémentaire de la séquence insérée du moule, et la libération et l'isolement de la sonde obtenue dans de simples conditions de dénaturation, le moule restant immobilisé sur son support.

10 **10.** Procédé suivant l'une ou l'autre des revendications 8 et 9, caractérisé en ce qu'il comprend sa répétition à plusieurs reprises sur le même moule immobilisé, en permettant la formation d'un nombre correspondant de sondes parfaitement identiques.

15 **11.** Procédé suivant l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend le marquage d'une manière appropriée quelconque de la sonde, de façon à permettre sa détection lors d'une mise en oeuvre ultérieure.

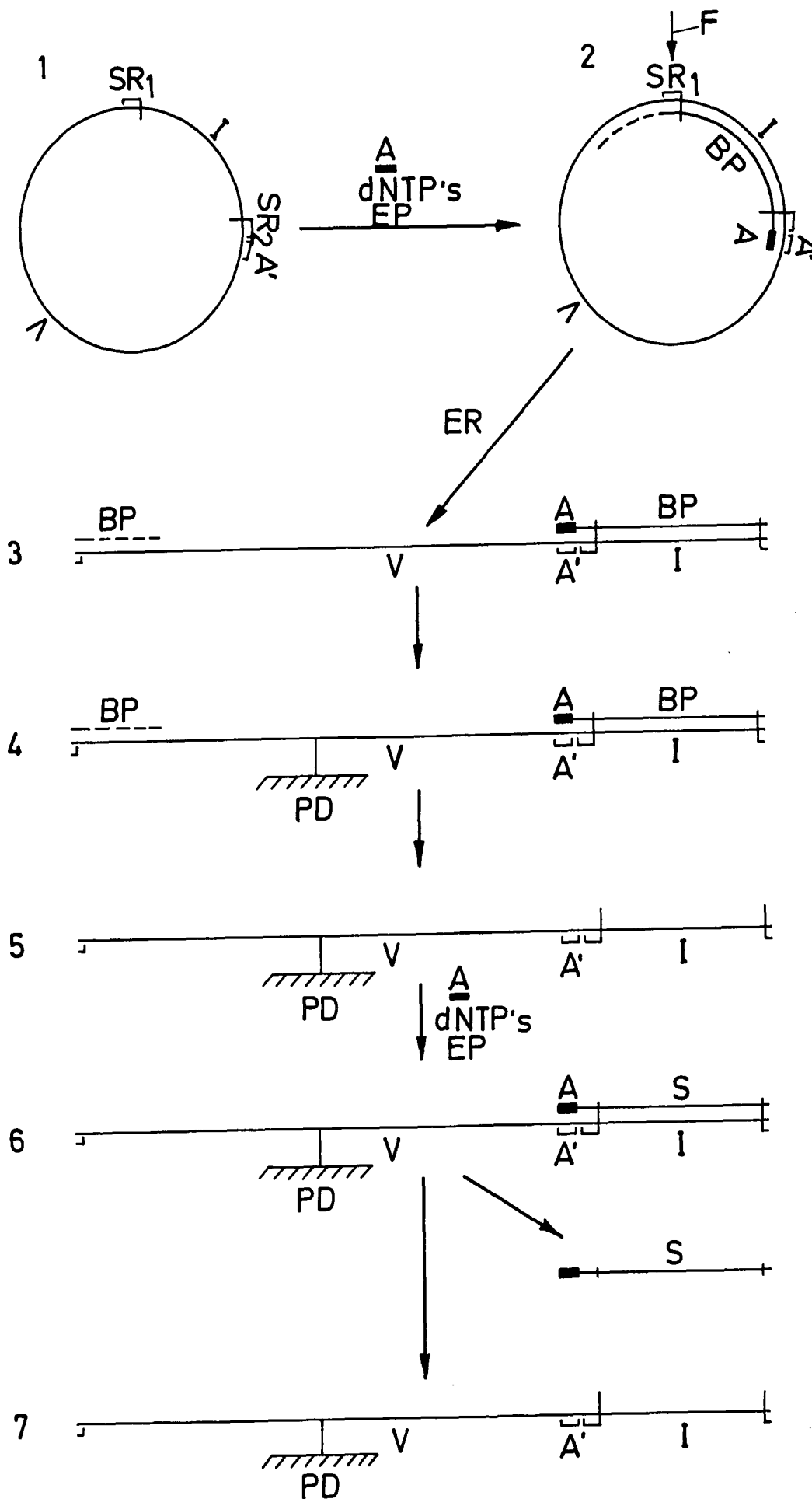
20 **12.** Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend l'allongement de l'amorce de séquence en présence de désoxynucléotides triphosphates marqués par un isotope de phosphore radioactif.

25 **13.** Application de sondes obtenues par un procédé de préparation de sonde suivant l'une quelconque des revendications 8 à 12, pour l'analyse de gènes, notamment pour la détection de séquences du génome total de longueurs très variables, y compris la détection de très petites séquences uniques dans le génome total et de séquences de plusieurs milliers de paires de base.

30 **14.** Moule de sonde de détection de séquence d'ADN, tel que décrit ci-dessus, notamment dans les exemples donnés, et/ou tel qu'illustré sur la figure unique annexée.

15. Procédé de préparation de moule de sonde de détection de séquence d'ADN et procédé de préparation d'une telle sonde, tels que décrits ci-dessus, notamment dans les exemples donnés, et/ou tel qu'illustrés sur la figure unique annexée.

904403



Bruxelles, le 12 mars 1986
 P. Pon. de Université Libre de Bruxelles (IRIBHN)
 P. Pon. de Bureau GEVERS S.A.